

Rec'd PCT/PTO 20 MAY 2005

PCT/JP 03/10449 ~~XXXX~~

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

19.08.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 2002年11月24日  
Date of Application:

出願番号 特願2002-382083  
Application Number:  
[ST. 10/C]: [JP 2002-382083]

出願人 第一製薬株式会社  
Applicant(s):

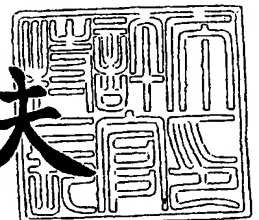


PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 9月19日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今井康夫



Best Available Copy

【書類名】 特許願

【整理番号】 NP02-1128

【特記事項】 特許法第30条第1項の規定の適用を受けようとする特  
許出願

【提出日】 平成14年11月24日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 A61P 35/000  
A61K 35/040

【発明の名称】 大腸癌転移抑制剤

【請求項の数】 25

【発明者】

【住所又は居所】 東京都多摩市貝取1493-1 シャロンパーク永山6  
04

【氏名】 秋山 徹

【発明者】

【住所又は居所】 東京都文京区向丘1-20-8 コートフェリシア20  
1

【氏名】 川崎 善博

【発明者】

【住所又は居所】 東京都文京区千駄木1-23-1-504

【氏名】 佐藤 梨奈

【特許出願人】

【識別番号】 000002831

【氏名又は名称】 第一製薬株式会社

【代理人】

【識別番号】 100088904

【弁理士】

【氏名又は名称】 庄司 隆

【電話番号】 03-3864-6572

【提出物件の目録】

【物件名】	明細書	1
【物件名】	図面	1
【物件名】	要約書	1

【書類名】 明細書  
【発明の名称】 大腸癌転移抑制剤  
【特許請求の範囲】

【請求項1】 Asef (APC-stimulated guanine nucleotide exchange factor) の機能阻害および／またはAsef 遺伝子の発現阻害を特徴とする大腸癌転移抑制剤。

【請求項2】 Asef (APC-stimulated guanine nucleotide exchange factor) 遺伝子の発現阻害を特徴とする大腸癌転移抑制剤。

【請求項3】 Asef (APC-stimulated guanine nucleotide exchange factor) のAPC (Adenomatous Polyposis Coli) 遺伝子産物との結合阻害を特徴とする大腸癌転移抑制剤。

【請求項4】 Asef (APC-stimulated guanine nucleotide exchange factor) のグアニンヌクレオチド交換因子 (Guanine nucleotide Exchange Factor) 活性の阻害を特徴とする大腸癌転移抑制剤。

【請求項5】 Asef (APC-stimulated guanine nucleotide exchange factor) の機能阻害および／またはAsef 遺伝子の発現阻害を特徴とする大腸癌転移抑制方法。

【請求項6】 Asef (APC-stimulated guanine nucleotide exchange factor) 遺伝子の発現阻害を特徴とする大腸癌転移抑制方法。

【請求項7】 Asef (APC-stimulated guanine nucleotide exchange factor) のAPC (Adenomatous Polyposis Coli) 遺伝子産物との結合阻害を特徴とする大腸癌転移抑方法。

【請求項8】 Asef (APC-stimulated guanine nucleotide exchange factor) のグアニンヌクレオチ

ド交換因子 (Guanine nucleotide Exchange Factor) 活性の阻害を特徴とする大腸癌転移抑制方法。

【請求項9】 Asef (APC-stimulated guanine nucleotide exchange factor) 遺伝子の発現に対するRNA干渉を利用することを特徴とするAsef阻害剤。

【請求項10】 Asef (APC-stimulated guanine nucleotide exchange factor) 遺伝子の発現に対するRNA干渉効果を示すオリゴヌクレオチドを含んでなるAsef阻害剤。

【請求項11】 配列表の配列番号1に記載の塩基配列からなるオリゴヌクレオチド。

【請求項12】 配列表の配列番号2に記載の塩基配列からなるオリゴヌクレオチド。

【請求項13】 配列表の配列番号3に記載の塩基配列からなるオリゴヌクレオチド。

【請求項14】 配列表の配列番号4に記載の塩基配列からなるオリゴヌクレオチド。

【請求項15】 配列表の配列番号1または3に記載の塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを含んでなる請求項10に記載のAsef阻害剤。

【請求項16】 Asef (APC-stimulated guanine nucleotide exchange factor) 遺伝子の発現に対するRNA干渉を利用することを特徴とするAsef阻害方法。

【請求項17】 Asef (APC-stimulated guanine nucleotide exchange factor) 遺伝子の発現に対するRNA干渉効果を示すオリゴヌクレオチドを利用することを特徴とするAsef阻害方法。

【請求項18】 配列表の配列番号1または3に記載の塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを利用することを特徴とする請求項17に記載のAsef阻害方法。

【請求項19】 請求項9、10および15のいずれか1項に記載のAsef阻

害剤を含んでなる大腸癌転移抑制剤。

【請求項 20】 配列表の配列番号 1 から 4 のいずれか 1 に記載の塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを含んでなる大腸癌転移抑制剤。

【請求項 21】 請求項 9、10 および 15 のいずれか 1 項に記載の Asef 阻害剤を用いることを特徴とする大腸癌転移抑制方法。

【請求項 22】 配列表の配列番号 1 から 4 のいずれか 1 項に記載の塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを用いることを特徴とする大腸癌転移抑制方法。

【請求項 23】 請求項 1 から 4、19 および 20 のいずれか 1 項に記載の大腸癌転移抑制剤、または、請求項 9、10 および 15 のいずれか 1 項に記載の Asef 阻害剤を含んでなる医薬組成物。

【請求項 24】 請求項 1 から 4、19 および 20 のいずれか 1 項に記載の大腸癌転移抑制剤、または、請求項 9、10 および 15 のいずれか 1 項に記載の Asef 阻害剤を含んでなる大腸癌の防止剤および／または治療剤。

【請求項 25】 請求項 1 から 4、19 および 20 のいずれか 1 項に記載の大腸癌転移抑制剤、または、請求項 9、10 および 15 のいずれか 1 項に記載の Asef 阻害剤を用いることを特徴とする大腸癌の防止方法および／または治療方法。

。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】

本発明は、Asef (APC-stimulated guanine nucleotide exchange factor) の機能阻害および／または Asef の発現阻害を特徴とする、大腸癌転移抑制剤および大腸癌転移抑制方法に関する。さらに詳しくは、Asef の発現阻害、Asef の APC (Adenomatous Polyposis Coli) 遺伝子産物との結合阻害、または Asef のグアニンヌクレオチド交換因子 (Guanine nucleotide Exchange Factor; 以下、GEF と略称する) の活性の阻害を特徴とする、大腸癌転移抑制剤、Asef 阻害剤、医薬組成物、大腸癌の防止剤および／または治療剤、大腸癌転移抑制方法、並びに大腸癌の防止方

法および／または治療方法に関する。

#### 【0002】

##### 【従来の技術】

Asefは、本発明者らにより大腸癌抑制遺伝子関連蛋白質M1として見出され、既に特許出願されて公開された蛋白質である（特許文献1）（非特許文献1）。当該蛋白質は619アミノ酸残基からなる蛋白質であり、Db1相同（DH）ドメイン、プレックストリン（Preckstrin）相同（PH）ドメイン、Src相同3（SH3）ドメインをそのアミノ酸配列中に保有する。

#### 【0003】

Asefの作用の1つとして、Rhoファミリーの1つであるRacに特異的なGEF活性をもつことが知られている。すなわち、Asefは、Racに結合しGDP/GTP交換反応を促進してRacを活性化し、Racの関与する細胞情報伝達の下流に位置するNF $\kappa$ B、c-jun、SRE等に作用する。Rhoファミリーに属する蛋白質は低分子量G蛋白質であり、アクチンネットワークの再構成に重要な役割を果たし、それにより細胞運動および細胞間接着を調節している。したがって、Asefは、細胞のラメリポディア（葉状仮足）や細胞膜のラフリングを誘導し、細胞運動および細胞間接着に関与する可能性がある。

#### 【0004】

Asefは、癌抑制遺伝子APCの遺伝子産物と、該遺伝子産物のアルマジロリピートドメインを介して結合することが明らかになっている。AsefはAPC遺伝子産物によりGEF活性が正に調節される。そのため、APC遺伝子産物によるAsefを介した細胞膜のラフリングやラメリポディア形成の誘導が、イヌ腎臓由来上皮様細胞であるMDCK細胞で認められている。またAsefの細胞内局在は、APC遺伝子産物と同様に、細胞が大腸絨突起先端ヘクリプトから移動する際に、移動する細胞の微小管先端部位に集積していることが判明している。このことから、Asefが、大腸絨突起における細胞移動制御の鍵を握っている可能性がある。

#### 【0005】

一方、癌抑制遺伝子APC（非特許文献2）は、家族性腺腫性ポリポーシス（

familial adenomatous polyposis: FAP) の原因遺伝子として単離され、散发性大腸癌の約70%～約80%でその変異が認められている。APC遺伝子産物(以下、APCと称する)は、2,843個のアミノ酸からなる300kDaの巨大な蛋白質であり、そのアミノ酸配列中には、蛋白質間の相互作用の役割を担うアルマジロリピートドメインが存在する。大腸癌細胞で認められる多くの体細胞APC変異は、変異クラスター領域(MCR)と呼ばれるその中央領域内で生じ、例えば、マイクロチューブル、EB1、hDLGへの結合部位、および $\beta$ -カテニンおよびアキシンに対する少なくとも幾つかの部位が切断された切断APC(truncated APC)を生じる(非特許文献4; 非特許文献5; 非特許文献6; 非特許文献7および非特許文献8)。しかしながら、Asefへの結合に対応するAPCの領域は、アルマジロリピートドメインであり、ほとんどの変異APC中でその配列が維持されている(非特許文献6; 非特許文献7および非特許文献8)。APCは、一種の癌遺伝子産物である $\beta$ -カテニンに結合して分解を誘導する作用を有する(非特許文献2; 非特許文献3; 非特許文献4; 非特許文献5および非特許文献6)。 $\beta$ -カテニンは、Wnt/Winglessシグナル伝達因子の1つであり、カドヘリンの細胞質側ドメインに結合して細胞接着に役割を果たすと同時に、発生過程や腫瘍形成において重要な役割を担っている(非特許文献9および非特許文献10)。

#### 【0006】

Asefのアミノ酸配列およびその遺伝子の塩基配列は、GenBankにアクセッション番号AB042199として登録されている。また、APCのアミノ酸配列およびその遺伝子の塩基配列は、GenBankにアクセッション番号NM000038として登録されている。

#### 【0007】

【特許文献1】: 特開2001-057888号公報

【非特許文献1】: カワサキ(Kawasaki, Y.)ら、「サイエンス(Science)」、2000年、第289巻、p. 1194-1197

【非特許文献2】: キンツラー(Kinzler, K. W.)ら、「セル(Cell)



11)」、1996年、第87巻、p. 159-170

【非特許文献3】：ファーンヘッド (Fearnhead) ら、「ヒューマン  
モレキュラー ジェネティクス (Human Molecular Genetics)」、2001年、第10巻、p. 721-733

【非特許文献4】：ビーンズ (Bienz, M.) ら、「セル (Cell)」、  
2000年、第103巻、p. 311-320

【非特許文献5】：ペリファー (Perifer, M.) ら、「サイエンス (S  
cience)」、2000年、第287巻、p. 1606-1609

【非特許文献6】：アキヤマ (Akiyama, T)、「サイトカイン アンド  
グロースファクター レビューズ (Cytokine and Growth  
Factor Reviews)」、2000年、第11巻、p. 273-28  
2

【非特許文献7】：ミヨシ (Miyoshi, Y.) ら、「ヒューマン モレキ  
ュラー ジェネティクス (Human Molecular Genetics  
)」、1992年、第1巻、p. 229-233

【非特許文献8】：ナガワ (Nagawa, H.) ら、「ヒューマン ミューテ  
ーション (Human Mutation)」、1993年、第2巻、p. 42  
5-434

【非特許文献9】：「セル (Cell)」、1996年、第86巻、p. 391  
-399, 1996

【非特許文献10】：「ネイチャー (Nature)」、1996年、第382  
巻、p. 638-642

#### 【0008】

##### 【発明が解決しようとする課題】

Asefについては、上記のように腫瘍形成や発生過程において重要な役割を  
担う癌抑制遺伝子APCの遺伝子産物と結合することが知られているが、細胞に  
おけるその作用および疾患との関連は未だ明らかにされていない。解決しよう  
とする課題は、Asefの作用を明らかにし、その機能の調節により、Asefに  
起因する疾患の防止および治療を可能にする手段を提供することである。

## 【0009】

## 【解決するための手段】

本発明者らは、Asef の GEF 活性およびその細胞内局在から、Asef の、細胞運動および細胞間接着への関与可能性を推察し、Asef が大腸癌、特に APC 変異が認められる大腸癌において、大腸癌細胞の運動性を高め、その転移に関与することを見出した。そして、この知見を利用し、Asef の機能阻害および／または Asef 遺伝子の発現阻害により大腸癌転移が抑制されることを見出して、本発明を完成した。

## 【0010】

すなわち、本発明は、

- (1) Asef の機能阻害および／または Asef 遺伝子の発現阻害を特徴とする大腸癌転移抑制剤、
- (2) Asef 遺伝子の発現阻害を特徴とする大腸癌転移抑制剤、
- (3) Asef の APC 遺伝子産物との結合阻害を特徴とする大腸癌転移抑制剤、
- (4) Asef の GEF 活性の阻害を特徴とする大腸癌転移抑制剤、
- (5) Asef の機能阻害および／または Asef 遺伝子の発現阻害を特徴とする大腸癌転移抑制方法、
- (6) Asef 遺伝子の発現阻害を特徴とする大腸癌転移抑制方法、
- (7) Asef の APC 遺伝子産物との結合阻害を特徴とする大腸癌転移抑制方法、
- (8) Asef の GEF 活性の阻害を特徴とする大腸癌転移抑制方法、
- (9) Asef 遺伝子の発現に対する RNA 干渉を利用することを特徴とする Asef 阻害剤、
- (10) Asef 遺伝子の発現に対する RNA 干渉効果を示すオリゴヌクレオチドを含んでなる Asef 阻害剤、
- (11) 配列表の配列番号 1 に記載の塩基配列からなるオリゴヌクレオチド、
- (12) 配列表の配列番号 2 に記載の塩基配列からなるオリゴヌクレオチド、
- (13) 配列表の配列番号 3 に記載の塩基配列からなるオリゴヌクレオチド、

- (14) 配列表の配列番号4に記載の塩基配列からなるオリゴヌクレオチド、
- (15) 配列表の配列番号1または配列番号3に記載の塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを含んでなる前記(10)のAsef阻害剤、
- (16) Asef遺伝子の発現に対するRNA干渉を利用することを特徴とするAsef阻害方法、
- (17) Asef遺伝子の発現に対するRNA干渉効果を示すオリゴヌクレオチドを利用することを特徴とするAsef阻害方法、
- (18) 配列表の配列番号1または3に記載の塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを利用することを特徴とする前記(17)のAsef阻害方法、
- (19) 前記(9)、(10)および(15)のいずれかのAsef阻害剤を含んでなる大腸癌転移抑制剤、
- (20) 配列表の配列番号1から4のいずれかに1に記載の塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを含んでなる大腸癌転移抑制剤、
- (21) 前記(9)、(10)および(15)のいずれかのAsef阻害剤を用いることを特徴とする大腸癌転移抑制方法、
- (22) 配列表の配列番号1から4のいずれかの塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを用いることを特徴とする大腸癌転移抑制方法、
- (23) 前記(1)から(4)、(19)および(20)のいずれかの大腸癌転移抑制剤、または、前記(9)、(10)および(15)のいずれかのAsef阻害剤を含んでなる医薬組成物、
- (24) 前記(1)から(4)、(19)および(20)のいずれかの大腸癌転移抑制剤、または、前記(9)、(10)および(15)のいずれかのAsef阻害剤を含んでなる大腸癌の防止剤および／または治療剤、
- (25) 前記(1)から(4)、(19)および(20)のいずれかの大腸癌転移抑制剤、または、前記(9)、(10)および(15)のいずれかのAsef阻害剤を用いることを特徴とする大腸癌の防止方法および／または治療方法、からなる。

【0011】

【発明の実施の形態】

本発明においては、Asefが上皮由来細胞の細胞間接着を低減させると共にその運動性を顕著に促進することを見出した。さらに、これらの作用が、APCにより調節されており、特に大多数の大腸癌細胞で同定されている断片化した変異APCがAsefを効率よく活性化することを見出した。これらから、変異APCとAsefとの複合体形成が、大腸癌細胞の異常な運動性の原因の1つと考えた。つまり、腸管上皮細胞の上方への遊走、すなわちクリプト (crypt) から絨毛状突起先端 (villus tip) への遊走に当該複合体が関与していると推定した。実際、APC遺伝子の強制発現が腸管上皮において細胞遊走の異常を引き起こすことが知られている (ウォン (Wong, M. H.) ら、「Proceeding of national academy of science USA」, 1996年、第93巻、p. 9588-9593)。APCノックアウトマウスにおいて、初期腺腫細胞の増殖速度は正常クリプト上皮細胞のものと同じであるが、腺腫細胞はクリプト-絨毛突起軸に沿う有向遊走をしないことが知られている (オーシマ (Oshima, H.) ら、「Cancer Research」, 1997年、第57巻、p. 1644-1649)。このように、APC切断変異体によるAsefの活性化に基づいた異常な遊走態様は、腺腫形成と同様に腫瘍の侵襲性悪性腫瘍への悪化に重要であると考えられる。また、AsefのGEF領域を欠損させた変異体は、細胞間接着および細胞運動性に影響しないことから、GEF活性がAsefのかかる機能に重要であると推定した。

#### 【0012】

これらから、Asefと変異APCの結合を阻害するドミナントネガティブ変異体、例えばAsefのアミノ酸配列中のAPC結合領域 (第73番目のアミノ酸から126番目まで) からなる変異体またはAsefのGEF領域を欠失させた変異体を用いて、変異APCを発現する大腸癌細胞の運動性を阻害できることを明らかにした。また、Asef遺伝子またはAPC遺伝子の発現阻害により、同様に、変異APCを発現する大腸癌細胞の運動性を阻害できることを明らかにした。さらに、上記ドミナントネガティブ変異体の使用により、あるいはAse

f 遺伝子またはAPC遺伝子の発現阻害により、SCIDマウスにおけるヒト大腸癌細胞の造腫瘍性、増殖性、さらに転移を抑制できることを明らかにした。すなわち、Asefの機能阻害および／またはAsef遺伝子の発現阻害により、細胞の運動性を阻害でき、さらには、腫瘍細胞の転移を抑制できる。

#### 【0013】

上記知見に基づいて、本発明は、Asefの阻害を特徴とする大腸癌転移抑制剤および大腸癌転移抑制方法を提供する。当該大腸癌転移抑制剤および大腸癌転移抑制方法は、Asefの機能阻害および／またはAsef遺伝子の発現阻害を特徴とする。Asefの機能阻害は、例えばAsefとAPCとの結合阻害、またはAsefのGEF活性の阻害により実現可能である。阻害されるAsefとAPCとの結合は、好ましくはAsefと正常なAPCとの結合、より好ましくはAsefとAPC変異体との結合、さらに好ましくはAsefとAPC切断変異体との結合、さらにより好ましくはAsefとアルマジロ リピート ドメインを含むAPC切断変異体との結合である。アルマジロ リピート ドメインを含むAPC切断変異体としては、APCのアミノ酸配列のN末端第1番目から第876番目の連続するアミノ酸残基からなるポリペプチド、またはAPCのアミノ酸配列のN末端第1番目から第1309番目の連続するアミノ酸残基からなるポリペプチドを例示できる。これらのポリペプチドは、APC切断変異体として、多くの大腸癌および家族性腺腫性ポリポーシス（FAP）で同定されたものである。

#### 【0014】

Asef遺伝子の発現阻害は、例えばAsef遺伝子の発現に対するRNA干渉（RNA interference）効果を利用することによって実現可能である。RNA干渉は、RNAを利用して遺伝子の発現を抑制する方法として、近年報告された方法である（パディソン（Paddison, P. J.）ら、「ジーンズ アンド ディベロプメント（Genes and Development）」、2002年、第16巻、p. 948-958）。具体的には、Asef遺伝子の発現に対するRNA干渉（RNA interference）効果を示すオリゴヌクレオチドを使用して、Asef遺伝子の発現阻害が可能であ

る。かかるオリゴヌクレオチドとして、配列表の配列番号 1 に記載の塩基配列からなる cDNA が例示できる。また、当該 cDNA の相補的 RNA（配列表の配列番号 3）も同様に使用できる。かかる cDNA を含むベクターまたはその相補的 RNA を細胞に導入することにより、Asef 遺伝子の発現阻害を実現できる。ベクターまたは RNA の細胞への導入は、自体公知の方法、例えばリポフェクション等を利用して実施可能である。したがって、上記オリゴヌクレオチドを含む Asef 阻害剤も、本発明の範囲に包含される。かかる Asef 阻害剤に含まれるオリゴヌクレオチドは、1 種であってよく、また 2 種以上が含まれていてもよい。また、Asef 遺伝子の発現阻害は、Asef 遺伝子のアンチセンスオリゴヌクレオチドの使用によっても、実現可能である。上記 RNA 干渉効果を示すオリゴヌクレオチドまたは上記アンチセンスオリゴヌクレオチドは、Asef 遺伝子の塩基配列を基に設計したオリゴヌクレオチドから、Asef 遺伝子の発現系を用いて、その発現を特異的に阻害するものを選択することにより得ることができる。

#### 【0015】

Asef と APC との結合阻害は、該結合に対する Asef のドミナントネガティブ変異体を使用して実現できる。例えば、APC と結合できるが、GEF 活性を示さない Asef 変異体は、Asef と APC との結合阻害剤として使用可能である。かかる Asef 変異体は、Asef のアミノ酸配列に基づいて設計し、APC との結合活性を常法により試験することにより得られる。具体的には、Asef の GEF 領域で欠損させた変異体が例示できる。あるいは Asef のアミノ酸配列中の APC 結合領域（第 73 番目のアミノ酸から 126 番目まで）からなるポリペプチドが好ましく用いられる。このポリペプチドのアミノ酸配列に基づいて設計したポリペプチドから、Asef と APC の結合を阻害するものを選択して用いることも可能である。また、APC 遺伝子の発現阻害によっても、Asef と APC との結合阻害は達成できる。APC 遺伝子の発現阻害は、APC 遺伝子の発現に対する RNA 干渉効果を示すオリゴヌクレオチドを用いて実現可能である。かかるオリゴヌクレオチドとして、配列表の配列番号 2 に記載の塩基配列からなる cDNA が例示できる。また、当該 cDNA の相補的 RNA（配

列表の配列番号 4) も同様に使用できる。あるいは、APC 遺伝子のアンチセンスオリゴヌクレオチドの使用によっても、APC 遺伝子の発現阻害は実現可能である。上記 RNA 干渉効果を示すオリゴヌクレオチドまたは上記アンチセンスオリゴヌクレオチドは、APC 遺伝子の塩基配列を基に設計したオリゴヌクレオチドから、APC 遺伝子の発現系を用いて、その発現を特異的に阻害するものを選択することにより得ることができる。

#### 【0016】

As ef の GEF 活性の阻害は、例えば GEF 活性の阻害剤を、As ef を用いて同定し使用することにより実現できる。また、As ef 遺伝子の発現を阻害する化合物や As ef と APC との結合を阻害する化合物を、As ef 遺伝子を用いて、または As ef および APC を用いて同定して使用してもよい。化合物を同定するためのアッセイ系は、自体公知のスクリーニング系を利用して構築可能である。

#### 【0017】

上記 As ef 阻害剤を用いることにより、大腸癌の転移を抑制することが可能である。すなわち、上記 As ef 阻害剤を含んでなる大腸癌転移抑制剤および上記 As ef 阻害剤を用いることを特徴とする大腸癌転移抑制方法も、本発明の範囲に包含される。具体的には、例えば、配列表の配列番号 1 から配列番号 4 に記載のいずれか 1 つの塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを含んでなる大腸癌転移抑制剤が例示できる。また、これらいずれか 1 つのオリゴヌクレオチドを用いることを特徴とする大腸癌転移抑制方法を挙げることができる。

#### 【0018】

本発明に係る大腸癌転移抑制剤または As ef 阻害剤を適用することにより、大腸癌の造腫瘍性および転移を抑制することができる。すなわち、上記大腸癌転移抑制剤または As ef 阻害剤は、大腸癌および大腸癌転移の防止および／または治療に使用することができる。この観点から、上記大腸癌転移抑制剤または As ef 阻害剤を有効量含んでなる大腸癌の防止剤および／または治療剤も本発明の範囲に包含される。また、上記大腸癌転移抑制剤または As ef 阻害剤を使用することを特徴とする、大腸癌の防止方法および／または治療方法を提供可能で

ある。

#### 【0019】

このように、本発明においては、上記大腸癌転移抑制剤またはA s e f 阻害剤を含む医薬組成物を提供することが可能である。大腸癌転移抑制剤、医薬組成物、大腸癌の防止剤、および大腸癌の治療剤の処方は、適当な医薬担体と組み合わせて処方することが好ましい。かかる処方は、治療上有効量の本発明に係る大腸癌転移抑制剤、医薬組成物、大腸癌の防止剤、および大腸癌の治療剤、さらに医薬上許容される担体または賦形剤を含む。かかる担体としては、生理食塩水、緩衝化生理食塩水、デキストロース、水、グリセロール、エタノール、およびそれらの混合物が挙げられるがこれらに限らない。処方投与経路に適したものを選択すればよく、該処方は当業者によく知られている。これら大腸癌転移抑制剤、医薬組成物、大腸癌の防止剤、および大腸癌の治療剤は、単独で使用してもよく、あるいは治療に必要な他の化合物または医薬と一緒に使用してもよい。

#### 【0020】

本発明に係る大腸癌転移抑制剤、医薬組成物、大腸癌の防止剤、および大腸癌の治療剤の投与形態は、全身投与であっても局所投与であってもよい。全身投与の好ましい一態様は、注射、例えば静脈注射が挙げられる。皮下、筋肉内または腹腔内のような他の注射経路を用いることもできる。投与の別の態様は、腸溶処方またはカプセル処方がうまく処方されるならば、経口投与も可能である。さらに、胆汁酸塩またはフシジン酸または他の界面活性剤のような浸透剤を用いる経粘膜投与もしくは経皮投与を用いることもできる。局所的な投与においては、膏薬、パスタ、ゲル等の形態での投与であってもよい。

#### 【0021】

また、上記のようなオリゴヌクレオチドを用いるときは、遺伝子治療を利用して、当該オリゴヌクレオチドを対象中の細胞内で生成させてもよい。遺伝子治療は、公知の方法が利用できるが、例えば、上記のようなオリゴヌクレオチドを組み入れた複製欠損レトロウイルスベクターを作成して用いることにより実施可能である。

#### 【0022】



必要な用量範囲は、上記大腸癌転移抑制剤、医薬組成物、大腸癌の防止剤、および大腸癌の治療剤の有効性、投与経路、処方剤の性質、対象の症状の性質、および担当医師の判断による。具体的には、適当な用量は、例えば対象の体重 1 kg あたり 0.1  $\mu$ g 乃至 100  $\mu$ g の範囲である。しかしながら、当該分野においてよく知られた最適化のための一般的な常套的実験を用いてこれらの用量の変更を行うことができる。

#### 【0023】

製剤化にあたっては、例えばペプチド、蛋白質、オリゴヌクレオチド、または化合物等各対象の物性に応じた公知の製剤化手段を導入すればよい。具体的には、例えば散剤、丸剤、錠剤、カプセル製剤、水溶液製剤、エタノール溶液製剤、リポソーム製剤、脂肪乳剤、またはシクロデキストリン等の包接体等の製剤化方法が利用できる。

#### 【0024】

散剤、丸剤、カプセル剤および錠剤は、ラクトース、グルコース、シュクロースおよびマンニトール等の賦形剤、澱粉およびアルギン酸ソーダ等の崩壊剤、マグネシウムステアレートおよびタルク等の滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロースおよびゼラチン等の結合剤、脂肪酸エステル等の界面活性剤、グリセリン等の可塑剤等を用いて製造できる。錠剤やカプセルを製造するには、固体の製薬担体を用いられる。

#### 【0025】

懸濁剤は、水、シュクロース、ソルビトールおよびフラクトース等の糖類、ポリエチレングリコール (PEG) 等のグリコール類、油類を使用して製造できる。

#### 【0026】

注射用の溶液は、塩溶液、グルコース溶液、または塩水とグルコース溶液の混合物からなる担体を用いて調製可能である。

#### 【0027】

リポソーム化は、例えばリン脂質を有機溶媒（クロロホルム等）に溶解した溶液に、当該物質を溶媒（エタノール等）に溶解した溶液を加えた後、溶媒を留去

し、これにリン酸緩衝液を加え、振とう、超音波処理および遠心処理した後、上清をろ過処理して回収することにより行い得る。

#### 【0028】

脂肪乳剤化は、例えば当該物質、油成分（大豆油、ゴマ油およびオリーブ油等の植物油並びにMCT等）、乳化剤（リン脂質等）等を混合、加熱して溶液とした後に、必要量の水を加え、乳化機（ホモジナイザー、例えば高圧噴射型や超音波型等）を用いて、乳化・均質化処理して行い得る。また、これを凍結乾燥化することも可能である。なお、脂肪乳剤化するとき、乳化助剤を添加してもよく、乳化助剤としては、例えばグリセリンや糖類（例えばブドウ糖、ソルビトールおよび果糖等）が例示される。

#### 【0029】

シクロデキストリン包接化は、例えば当該物質を溶媒（エタノール等）に溶解した溶液に、シクロデキストリンを水等に加温溶解した溶液を加えた後、冷却して析出した沈殿をろ過し、滅菌乾燥することにより行い得る。この際、使用されるシクロデキストリンは、当該物質の大きさに応じて、空隙直径の異なるシクロデキストリン（ $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 型）を適宜選択すればよい。

#### 【0030】

##### 【実施例】

以下、本発明を実施例に基づき具体的に説明するが、本発明は下記の実施例に限定されない。

まず、以下の実施例で用いたAsefまたはAPC、あるいはそれらの変異体について説明する。当該蛋白質および当該変異体は、略称で記載する。

Asef-fullは、野生型の全長Asefからなる蛋白質である。ヘマグルチニン（Haemagglutinin；HA）タグを付加した融合蛋白質（HA-tagged wild-type Asef）、またはグルタチオンS-トランスフェラーゼ（Glutathione S-transferase；GST）との融合蛋白質（GST-Asef-full）として発現させた。

Asef- $\Delta$ APCは、AsefのN末端側APC結合領域で欠損させた変異

体である。この変異体は野生型Asefより強いGEF活性を有する。

Asef- $\Delta$ DHは、AsefのDH領域（GEF領域）で欠損させた変異体である。該変異体はGEF活性を示さない。

Asef-ABRは、Asefのアミノ酸配列中のAPC結合領域（第73番目のアミノ酸から126番目まで）からなるポリペプチドである。マルトース結合たんぱく質（MBP）との融合蛋白質（MBP-Asef-ABR）として発現させた。

APC-armは、APCのアルマジロ リピー トドメインからなる蛋白質であり、Mycタグを付加した融合蛋白質（Myc-tagged APC-arm）として発現させた。

APC-876は、APCのアミノ酸配列のN末端第1番目から第876番目までの連続するアミノ酸残基からなるポリペプチドであり、アルマジロ リピー トドメインを含んでいる。

APC-1309は、APCのアミノ酸配列のN末端第1番目から第1309番目までの連続するアミノ酸残基からなるポリペプチドであり、アルマジロ リピー トドメインを含んでいる。

APC-876およびAPC-1309は、大腸癌および家族性腺腫性ポリポーシス（FAP）で同定されたAPC切断変異体である。

#### 【0031】

これらのいずれかをコードするDNAを含むアデノウイルスの作製は、アデノ-XTM エクスプレッション システム（クロンテック社）を用いて、各蛋白質をコードするポリヌクレオチドを、アデノウイルス ベクター pAdeno-Xにクローン化することにより行なった。

#### 【0032】

これらのいずれかをコードするDNAを含むプラスミドの作製は、常法にしたがって行なった。

#### 【0033】

細胞の培養および上記プラスミドによる形質転換は、以下のように行なった。  
MDCK細胞（正常なイヌの腎より樹立された上皮様細胞株）およびWiDr細

胞はダルベッコ改変イーグル培地に10%牛胎児血清(FCS)を加えて培養した。SW480細胞はレイボビッツ L-15培地に10%FCSを加えて培養した。DLD-1細胞およびHCT15細胞は、RPMI1640培地に10%FCSを加えて培養した。HCT116細胞はマッコイ5A培地に10%FCSを加えて培養した。これらの細胞は、リポフェクトアミン2000(ライフ テクノロジー社)を用いて、上記プラスミドで形質転換した。

#### 【0034】

蛋白質の発現および作製は、次のように行なった。GSTとの融合蛋白質またはMBPとの融合蛋白質は、大腸菌で合成し、グルタチオンセファロース(GSH-Sepharose; ファルマシア社)またはアミロース レジン(amylose resin; ニューイングランド バイオラボズ社)への吸着により単離した。

#### 【0035】

RNA干渉試験に用いるショートヘアピンRNA(shRNA)である、shRNA-AsefおよびshRNA-APCは、それぞれAsef遺伝子およびAPC遺伝子の発現を抑制するように設計した。shRNA-AsefおよびshRNA-APCの塩基配列は配列表の配列番号1および配列番号2にそれぞれ記載した。また、shRNA-AsefおよびshRNA-APCにそれぞれ変異を加え、Asef遺伝子およびAPC遺伝子の発現を抑制しないshRNAである、mut-shRNA-Asefおよびmut-shRNA-APCを作成し、配列表の配列番号5および配列番号6にそれぞれ記載した。

#### 【0036】

##### 【実施例1】

細胞間接着および細胞形態に対するAsefの効果を検討するため、MDCK細胞に上記アデノウイルスを感染させた。使用したアデノウイルスは、AdAsef-full、AdAsef- $\Delta$ APC、AdAsef- $\Delta$ DHおよびAdAPC-armである。対照として、AdLacZを用いた。MDCK細胞へのアデノウイルスの感染効率は、免疫蛍光染色での検討により、90%以上であることを確認した。また、これらアデノウイルスはそれぞれ、MDCK細胞に感染さ

せると予想通りの大きさの蛋白質を生産することを、イムノプロットングにより確認した。

### 【0037】

細胞形態は、感染させた細胞を12ウエルの組織培養プレートの各ウエルに細胞数 $3.0 \times 10^4$ となるように播種し、37℃で3時間インキュベーションした後、アデノウイルスで感染させ（感染多重度: multiplicity of infection (m. o. i) - 200）、さらに36時間培養後、位相差顕微鏡で観察した。AdAsef-ΔAPCで感染させた細胞は基底上で平面状になり、膜のラッフリングおよびラメリポディアを示した。一方、AdAsef-ΔDHで感染させた細胞は、形態変化を示さず、未感染の細胞と変わらなかった。

### 【0038】

細胞間接着は、感染させた細胞を0.02%EDTA（エチレンジアミン四酢酸）を含むリン酸緩衝生理食塩水（PBS）中でプレートから剥がし、20回ピペッティングした後に、細胞クラスター（粒子）の数を計数した。細胞クラスターを総細胞数で割った値（ $N_p / N_c$ ）で、細胞間接着を評価した。ピペッティングにより分散させると、AdAsef-ΔAPCで感染させた細胞は効率よく分離したが、未感染細胞およびAdAsef-ΔDHまたはAdLacZで感染させた細胞は凝集塊のままであった（図1）。これらの結果から、Asefが細胞間接着を低減させる機能を持つこと、またそのGEF活性がこの機能に必須であることが明らかになった。

### 【0039】

さらに、AdAsef-fullまたはAdAsef-ΔAPCを過剰発現させると、細胞間接触部位に局在するE-カドヘリン量が減少し、細胞質に局在するE-カドヘリン量が増加することを、抗E-カドヘリン抗体を使用した免疫組織化学分析により明らかにした。免疫組織化学分析は、アデノウイルス感染36時間後に、MDCK細胞をPBS中3.7%のホルムアルデヒドで固定して行った。固定した細胞はE-カドヘリンに対するラットmAb（ECCD-2；カルビオケム社）およびトリメチルローダミン イソチオシアネート結合ファロイジ

ン (TRITC-conjugated phalloidin; モレキュラー  
プローブ社)、またはE-カドヘリンに対するラットmAbおよび $\beta$ -カテ  
ニンに対するウサギpAb (サンタクルス バイオテクノロジー社) で室温にて  
60分間二重染色した。抗E-カドヘリン抗体および抗 $\beta$ -カテニン抗体により  
得られた染色パターンは、フルオレセイン イソチオシアネート標識抗ラットI  
gG抗体およびTRITC標識抗ラビットIgG抗体を用いて可視化した。細胞  
はカールツァイス LSM510レーザー スキャニング マイクロスコープを  
用いて撮影した。抗 $\beta$ -カテニン抗体で染色すると、細胞間接触部位に局在する  
 $\beta$ -カテニン量が減少することがわかったが、この減少はE-カドヘリンほど顕  
著ではなかった。一方、AdAsef- $\Delta$ DHまたはAdLacZで感染させた  
細胞は、E-カドヘリンまたは $\beta$ -カテニンの局在について変化を示さなかった  
。これらから、AsefのGEF活性がこれら分子の局在の変化に重要であると  
考えられた。MDCK細胞の溶解物のイムノブロット解析によれば、E-カドヘ  
リンまたは $\beta$ -カテニンの総量はAdAsef-fullまたはAdAsef- $\Delta$ APCでの感染で著しい変化はなかった。これらから、Asef遺伝子の発現  
の結果生じる細胞間接着の低減は、細胞間接触部位でのE-カドヘリンおよび $\beta$ -  
カテニンの減少によることが判明した。

#### 【0040】

##### 【実施例2】

細胞の運動性に対するAsefの効果を、上記プラスミドを用いてAsef遺  
伝子またはAPC遺伝子、あるいはそれらの変異体遺伝子を発現させたMDCK  
細胞を用いて検討した。細胞の運動性は、トランスウエル マイグレーション  
チャンバーを用いた細胞遊走試験により行った。該チャンバーは、MDCK細胞  
には直径12mmでポアサイズ12 $\mu$ mのものを用いた(コスター社)。形質転  
換18時間後に、細胞数 $3.0 \times 10^4$ のMDCK細胞をチャンバーの上室に加  
え、18時間で上室の下側へ遊走させた。細胞遊走は、ポリカーボネート フィ  
ルターの低層側に遊走した細胞を計数して測定した。

#### 【0041】

Asef-fullをコードするDNAを含むプラスミドで形質転換した細胞

は、親細胞(MDCK)またはベクターで形質転換した細胞(Mock)と比較して運動性が促進した(図2)。Asef-fullと共に、APC-arm、APC-876およびAPC-1309のいずれか1つを共発現させた細胞は、Asef-fullのみで形質転換したものよりも運動性が促進した。細胞の運動性に対するAsefの促進能へのAPCの効果は、APC-arm、APC-876およびAPC-1309の方がAPC-fullより強かった。一方、APC-armのみでは遊走を刺激しなかった。また、Asef-ΔAPCで形質転換した細胞は、Asef-fullおよびAPC-armで共形質転換したものよりもさらに亢進した遊走反応を示した。これらから、AsefはMDCK細胞の遊走を促進する能力を保有することが明らかになった。Asefのこの能力は、APC、特にアルマジロ リピート ドメインを含むAPC切断変異体(Asef-Arm)によりさらに促進されることが判明した。さらに、Asef-ΔDHがMDCK細胞の遊走を促進しなかったことから、AsefのGEF活性がこの遊走刺激活性に必要であると考えられた。

#### 【0042】

しかしながら、Asef-ABRをAPC-1309と共に発現させたとき、細胞遊走の促進はほぼ完全に阻害された。Asef-ΔDHもAPC-1309が介する細胞遊走の促進を阻害した。これらから、大腸癌またはFAPで同定されたAPC変異体であるAPC-879およびAPC-1309は、Asefと相互作用してその活性を促進し、それにより細胞遊走を促進すると考えられた。一方、全長APCでMDCK細胞形質転換しても、Asefが誘導する遊走の促進はみられなかった(図2)。このことから、大腸癌細胞においてAPCが変異による切断によって活性化されないと、APCはAsefの有効な活性剤にはならないと考えられた。

#### 【0043】

次に、AsefおよびAPC切断変異体を含むことが知られているSW480細胞の運動性について検討した。Asef-ABRをコードするDNAを含むプラスミドでSW480細胞を形質転換したところ、当該細胞の遊走は、親株またはMockより約50%低減した(図2)。同様に、Asef-ΔDHプラスミ

ドで形質転換したSW480細胞の遊走は約40%低減した。このことから、細胞で発現されたAsef-ABRまたはAsef-ΔDHが、AsefとAPC切断変異体の結合に対してドミナントネガティブに作用し、Asef-ABRまたはAsef-ΔDHによる細胞遊走を阻害することが分かった。

#### 【0044】

##### 【実施例3】

大腸癌細胞において、APC切断変異体とAsefとの結合について検討した。まず、細胞数 $5.0 \times 10^6$ のSW480細胞を、1%トリトンX-100を含むバッファーA [50mM Tris-HCl (pH 7.5)、150mM NaCl、5mM EDTA、2mM バナジン酸ナトリウム ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ )、10mM フッ化ナトリウム] 500  $\mu$ l 中で溶解した。溶解物を2  $\mu$ gの抗Asef抗体で4℃にて1時間インキュベーションした後、4℃で2時間かけて免疫複合体をプロテインG-セファロース6Bに吸着させた。0.1%トリトンX-100を含むバッファーAで何度も洗浄した後、試料をSDS-PAGEに溶解し、ポリビニリデン ジフルオリド膜フィルター (Immobilon P; ミリポア社) に転写した。プロットは、アルカリホスファターゼを結合させたマウス抗ウサギIgG抗体 (プロメガ社) を二次抗体として使用して、イムノブロットング分析に付した。用いたウサギ抗Asefポリクローナル抗体は、従前の方法で作製した (カワサキ (Kawasaki, Y.) ら、「サイエンス (Science)」、2000年、第289巻、p. 1194-1197)。

#### 【0045】

その結果、AsefはAPC切断変異体と共免疫沈降することが分かった (図3a)。また、AsefとAPC変異体との共沈は、抗体をその抗原の過剰量とともに4℃で2時間プレインキュベーションすることにより阻害された。これらから、AsefはSW480細胞中でAPC変異体と協働することが判明した。

#### 【0046】

次に、インビトロにおいて、GST-Asef-fullとAPC-armとを共免疫沈降させ、Asef-ABR添加の影響を検討した。まず、APC-Armをインビトロ翻訳により作製し (IVT-APC-Arm)、セファロース



に結合させたGST-Asef-fullとMBP-Asef-ABRの存在下でインキュベーションした。MBP-Asef-ABRに対するAPC-Arm量の比は、図3bに示したように変化させた。GST-Asef-full-Sepharoseに結合したAPC-armは、SDS-PAGEに次いでオートラジオグラフィーを行って可視化した(図3bの上パネル)。また、反応混合物に添加したMBP-Asef-ABRはゲルをクマシーブルー染色することにより可視化した(図3bの下パネル)。その結果、Asef-ABRを加えるとその量の増加に伴って、GST-Asef-fullとAPC-armとの共免疫沈降物が用量依存的に減少した。すなわち、インビトロにおいて、Asef-ABRがAsefとAPC変異体との結合を阻害することが明らかになった。

#### 【0047】

このように、AsefとAPC変異体との結合をドミナントネガティブな形で阻害するAsef-ABRを用いて、SW480細胞の遊走を阻害することができた。

#### 【0048】

##### 【実施例4】

各種大腸癌細胞株に、Asef-full、Asef- $\Delta$ APC、またはAsef- $\Delta$ DHをコードするDNAを含むアデノウイルスを感染させ、実施例2と同様に細胞遊走試験を行った。用いた大腸癌細胞株は、SW480、DLD-1、HCT15、WiDrおよびHCT116である。SW480細胞、DLD-1細胞、HCT15細胞、およびWiDr細胞は、APC切断変異体を含む。HCT116細胞は、正常APCを含むが、 $\beta$ -カテニンに変異が認められる。

#### 【0049】

結果を図4に示す。SW480細胞は、AdAsef-fullまたはAdAsef- $\Delta$ APCを感染させると、その運動性が促進した。また、SW480細胞、DLD-1細胞、HCT15細胞およびWiDr細胞は、AdAsef- $\Delta$ DHで感染させると、その運動性が部分的に阻害された。一方、HCT116細胞は、AdAsef- $\Delta$ DHにより阻害されなかった。このことから、HCT116中の全長APCはAsefを活性化できないと考えられた。これらの結果が

ら、AsefはAPC切断変異体を含む大腸癌細胞で活性化されるが、正常APCを含む細胞では活性化されないまたは活性化されにくいことが判明した。また、当該活性化は、Asef- $\Delta$ DHにより阻害されることが分かった。

#### 【0050】

##### 【実施例5】

大腸癌細胞の遊走におけるAsefとAPC変異体との相互作用を、RNA干渉(RNAi)試験により検討した。当該試験は、pSHAG-1ベクター システムを用いて行なった(パディソン(Paddison, P. J.)ら、「ジーンズ アンド ディベロプメント(Genes and Development)」、2002年、第16巻、p. 948-958)。用いた大腸癌細胞株は、SW480細胞、WiDr細胞、LS180細胞およびHCT116細胞である。SW480細胞およびWiDr細胞は、APC切断変異体を含む。LS180細胞およびHCT116細胞は、正常APCを含むが、 $\beta$ -カテニンに変異が認められる。

#### 【0051】

ショートヘアピンRNAであるshRNA-AsefまたはshRNA-APCのいずれかを含む発現ベクターで形質転換した各種大腸癌細胞について、実施例2と同様に細胞遊走試験を行った。その結果、shRNA-AsefまたはshRNA-APCのいずれかで形質転換したSW480細胞およびWiDr細胞は、mut-shRNA-Asefまたはmut-shRNA-APCで形質転換した細胞に比べて、運動性が低減した(図5)。一方、LS180細胞およびHCT116細胞では、このような現象は認められなかった。

#### 【0052】

次に、shRNA-Asef、shRNA-APC、mut-shRNA-Asefおよびmut-shRNA-APCのいずれか1つのオリゴヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換した細胞について、イムノブロッティング分析を実施例3と同様に実施した。このとき、対照として、 $\alpha$ -チューブリンの変化を測定した。その結果、shRNA-AsefおよびshRNA-APCが、それぞれAsef遺伝子およびAPC遺伝子の発現をほぼ完全に阻害することが分か

った。

### 【0053】

これらから、Asef 遺伝子または APC 遺伝子の発現阻害により、APC 切断変異を有する大腸癌細胞の運動性が低減されることが判明した。すなわち、大腸癌細胞の遊走に、APC 変異体と Asef との相互作用が重要な役割を果たすと考えられた。

### 【0054】

#### 【実施例 6】

ヒト SW480 大腸癌細胞に、Asef ドミナントネガティブ変異体である Asef-ABR を発現させて作成した細胞を、それぞれ SCID マウスに移植し、造腫瘍性や増殖の変化を観察した。Asef-ABR プラスミドは、SW480 大腸癌細胞に、リポフェクションにより導入した。得られた 3 つのクローンをそれぞれ、G418 を 1 mg/ml 含有する L-15 培地を使用してインビトロで培養し、一群当たり 2~4 匹の SCID マウス (8 週齢) の側腹部皮下に、細胞数  $1 \times 10^7 / 0.1 \text{ ml}$  / マウス移植した。腫瘍移植後 20 日目に腫瘍塊を摘出して重量を測定した。また、各クローンを移植したマウスの腫瘍塊の重量 (T) を対照群の値 (C) で割り、阻害比 (IR と略称する) として百分率で表した ( $IR (\%) = T / C \times 100$ )。移植した細胞で Asef-ABR が発現されていることは、常法により確認した。

### 【0055】

Asef-ABR のみを安定的に発現する 3 クローンのうち、2 クローンで造腫瘍性の低下や増殖の遅延が見られた (表 1)。これらから、Asef が造腫瘍性や腫瘍細胞増殖に関与すると考えられた。

### 【0056】

【表1】

群	重量 $\pm$ SD (g)	IR(%)	腫瘍生着/移植数
SW480	$0.496 \pm 0.080$	0	4/4
ABR-2	$0.609 \pm 0.069$	22.7	3/3
ABR-8	$0.000 \pm 0.000$	100	0/3
ABR-17	$0.203 \pm 0.056$	59.1	4/4

## 【0057】

## 【実施例7】

ヒトHT29大腸癌細胞株で作製したAsef-ABRクローン（実施例6参照）をSCIDマウスに移植し、造腫瘍性や増殖の変化を観察した。Asef-ABRプラスミド 15mgは、細胞数 $5 \times 10^6$ のHT29細胞に、リポフェクションにより導入した。得られた5つのクローンをそれぞれ、G418を1mg/ml含有するDMEM培地を使用してインビトロで培養し、一群あたり4匹のSCIDマウス（8週齢）の脾臓内に、細胞数 $1 \times 10^6 / 0.05 \text{ ml}$ /マウス移植した。腫瘍細胞移植後18日目に尾静脈内にインクを注入後、エーテル麻酔下で放血屠殺し、脾臓および肝臓を摘出して重量を測定した。

## 【0058】

HT29細胞で作製したAsef-ABRドミナントネガティブ変異体安定発現株5クローン中4クローンにおいて、脾臓や肝臓での腫瘍形成が認められなかった（表2）。実施例6でSW480大腸癌細胞を用いて作製した3クローンについても同様な現象が得られた。すなわち、Asefは造腫瘍性や腫瘍細胞増殖に関与することが判明した。またAsef-ABRドミナントネガティブ変異体安定発現株で、肝臓の腫瘍形成が認められなかったことから、Asef-ABRドミナントネガティブ変異体が、腫瘍の転移を抑制することが判明した。

## 【0059】

【表 2】

群	肝臓重量 $\pm$ SD (g)	脾臓重量 $\pm$ SD (mg)
正常	1.340 $\pm$ 0.176	30.8 $\pm$ 7.1
親株(HT29)	2.236 $\pm$ 0.153	124.5 $\pm$ 20.4
Asef-ABR-A7	1.584 $\pm$ 0.093	38.0 $\pm$ 3.9
Asef-ABR-B5	2.627 $\pm$ 0.392	129.3 $\pm$ 13.5
Asef-ABR-C3	1.579 $\pm$ 0.124	44.3 $\pm$ 11.0
Asef-ABR-C12	1.526 $\pm$ 0.070	37.8 $\pm$ 5.1
Asef-ABR-D11	1.359 $\pm$ 0.173	37.3 $\pm$ 4.6

## 【0060】

## 【発明の効果】

本発明においては、Asef が細胞の運動性を促進し、さらに細胞間接着を低減すること、Asef のこの機能が癌抑制遺伝子 APC の遺伝子産物により活性化されることを見出した。また、大腸癌、特に APC 変異が認められる大腸癌において、Asef が大腸癌細胞の運動性を高め、その造腫瘍性および転移に関与することを見出した。これらに基づいて本発明において提供する、Asef の機能阻害および／または Asef 遺伝子の発現阻害を特徴とする大腸癌転移抑制剤並びに大腸癌転移抑制方法は、大腸癌および大腸癌の転移の、防止および／または治療に多大な効果を有するものである。

## 【0061】

## 【配列表フリーテキスト】

配列番号 1: Asef 遺伝子の発現を抑制するために、ヒト Asef の塩基配列に基づいて設計したオリゴヌクレオチド。

配列番号 2: APC 遺伝子の発現を抑制するために、ヒト APC の塩基配列に基づいて設計したオリゴヌクレオチド。

配列番号 3: Asef 遺伝子の発現を抑制するために、ヒト Asef の塩基配列に基づいて設計したオリゴヌクレオチド。

配列番号 4: APC 遺伝子の発現を抑制するために、ヒト APC の塩基配列に基づいて設計したオリゴヌクレオチド。

配列番号 5：配列番号 1 に記載の塩基配列に基づいて設計したオリゴヌクレオチド。

配列番号 6：配列番号 2 に記載の塩基配列に基づいて設計したオリゴヌクレオチド。

【0062】

【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> DAIICHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.

<120> An inhibitory agent for metastasis of colon carcinoma

<130> NP02-1128

<160> 6

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Designed oligonucleotide based on the base sequence of human Asef  
to inhibit the expression of the Asef gene

<400> 1

aagccgactt ccagatctac tcggagtact g

31

<210> 2

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Designed oligonucleotide based on the base sequence of human APC  
to inhibit the expression of the APC gene

<400> 2

aactgaggca tclaatatga aggaagtact t

31

<210> 3

<211> 31

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> Designed oligonucleotide based on the base sequence of human Asef  
to inhibit the expression of the Asef gene

<400> 3

uucggcugaa ggucuagaug agccucauga c

31

<210> 4

<211> 31

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> Designed oligonucleotide based on the base sequence of human APC  
to inhibit the expression of the APC gene

<400> 4

uugacuccgu agauuauacu uccuucauga ε

31

<210> 5

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Designed oligonucleotide based on the base sequence of SEQ ID NO:  
1

<400> 5

aagacgactt ccaaattctac tcagagtact g

31

<210> 6

<211> 31

<212> DNA



<213> Artificial

<220>

<223> Designed oligonucleotide based on the base sequence of SEQ ID NO:  
2

<400> 6

aactaaggca tataatatga aggaaatact t

31

### 【図面の簡単な説明】

【図1】 A s e f をコードするDNAを含むアデノウイルスを感染させたMDCK細胞の細胞間接着が低減したことを示す図である。細胞間接着は、縦軸に示したように、凝集塊 (N p) 数を総細胞 (N c) 数で割った数値で示した。図中、A s e f - f u l l は全長A s e f 遺伝子；A P C - a r m はA P C 遺伝子のアルマジロ リピート ドメイン；A s e f - Δ A P C はA P C 結合部位を欠失したA s e f 変異体遺伝子；A s e f - Δ D H はD H ドメインで欠損させたA s e f 変異体遺伝子を含むアデノウイルスで細胞を感染させたことを示す。結果は3回の実験の平均値±標準偏差 (S D) である。

【図2】 A s e f 遺伝子、A P C 遺伝子、またはそれらの変異体遺伝子を発現させたMDCK細胞もしくはSW480細胞の遊走を示した図である。結果は、親細胞の遊走に対する相対的遊走 (r e l a t i v e m i g r a t i o n) で表した。

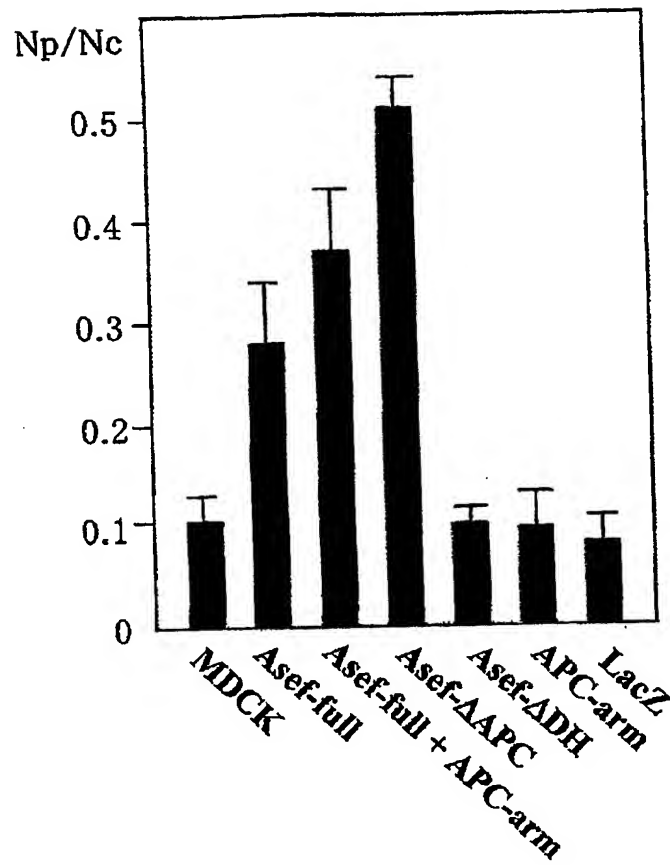
【図3】 図3aは、SW480細胞中でA s e f とA P C 切断変異体が結合することを、抗A s e f 抗体 (A n t i - A s e f) を用いた免疫沈降で解析した結果を示す。図中、+は免疫沈降前に抗原でプレインキュベーションした抗体を用いたことを示す。図3bは、A s e f - A B R が、インビトロでのI V T - A P C - a r m とG S T - A s e f - f u l l の相互作用を、用量依存的に阻害することを示す図である。図中、M W . は分子量マーカを示す。

【図4】 A s e f 遺伝子およびその変異体遺伝子を発現させた各種大腸癌細胞 (SW480、DLD-1、HCT15、WiDrおよびHCT116) の運動性を示す図である。結果は、対照であるL a c Z 遺伝子を発現させた各細胞の遊走に対する相対的遊走 (r e l a t i v e m i g r a t i o n) で表した

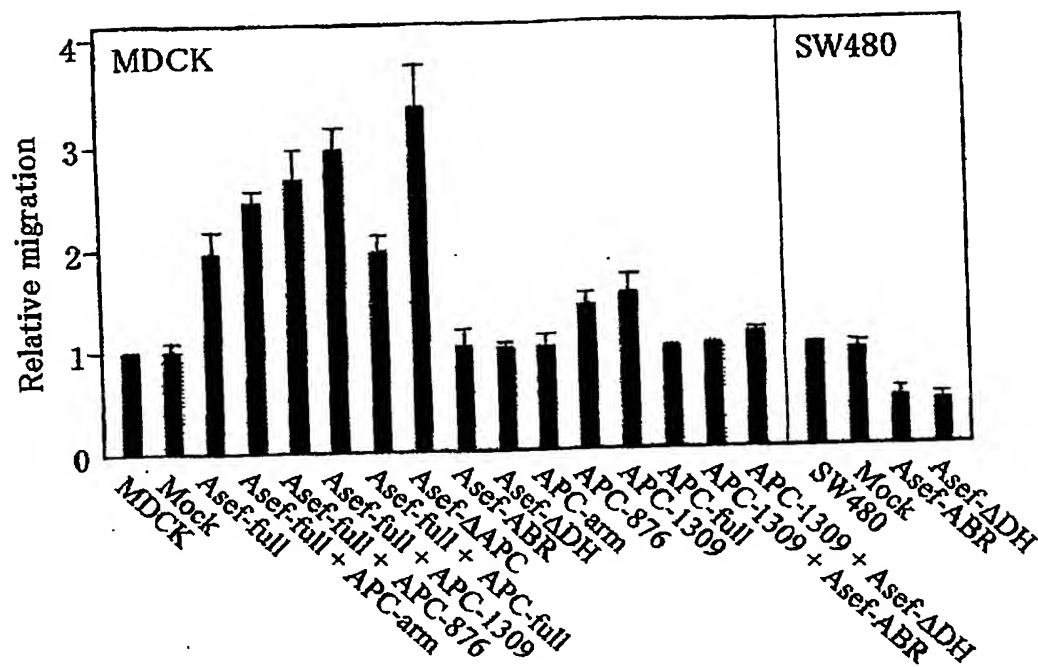
。 【図5】 A s e f 遺伝子またはA P C 遺伝子の発現を阻害するショートヘアピンRNAである s h RNA-A s e f または s h RNA-A P C が、A P C 変異を有する大腸癌細胞（S W 4 8 0 および W i D r）の運動性を低減させるが、正常A P C を有する大腸癌細胞（H C T 1 1 6 および L S 1 8 0）の運動性には影響しないことを示す図である。比較対照として、A s e f 遺伝子またはA P C 遺伝子の発現を阻害しない s h RNA である m u t - s h RNA-A s e f および m u t - s h RNA-A P C を用いた。結果は、m u t - s h RNA-A s e f で形質転換した各細胞の遊走に対する相対的遊走（r e l a t i v e m i g r a t i o n）で表した。

【書類名】 図面

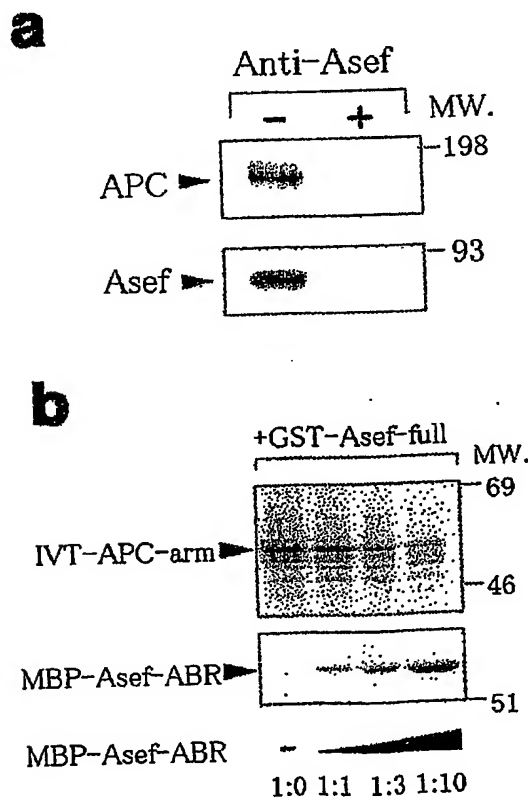
【図 1】



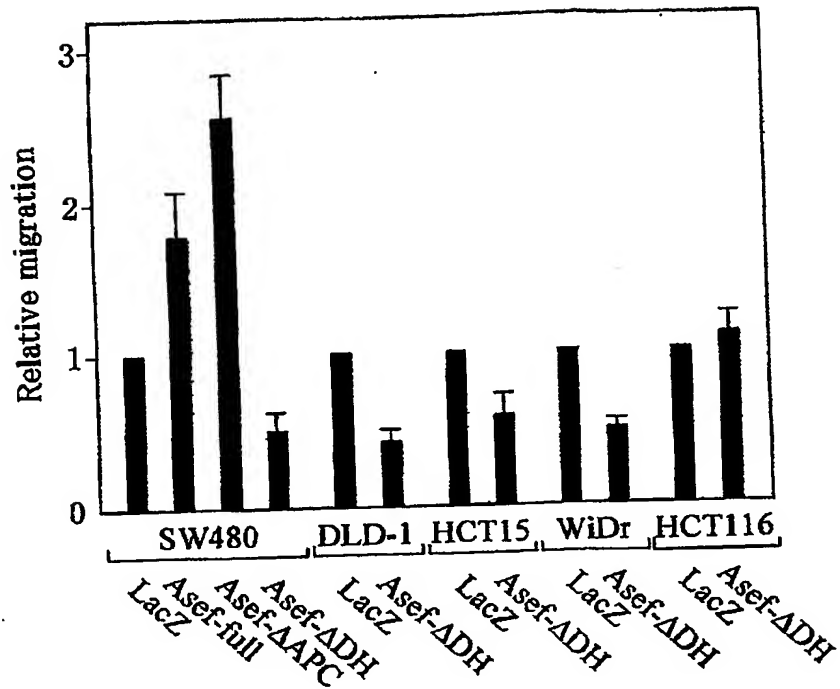
【図 2】



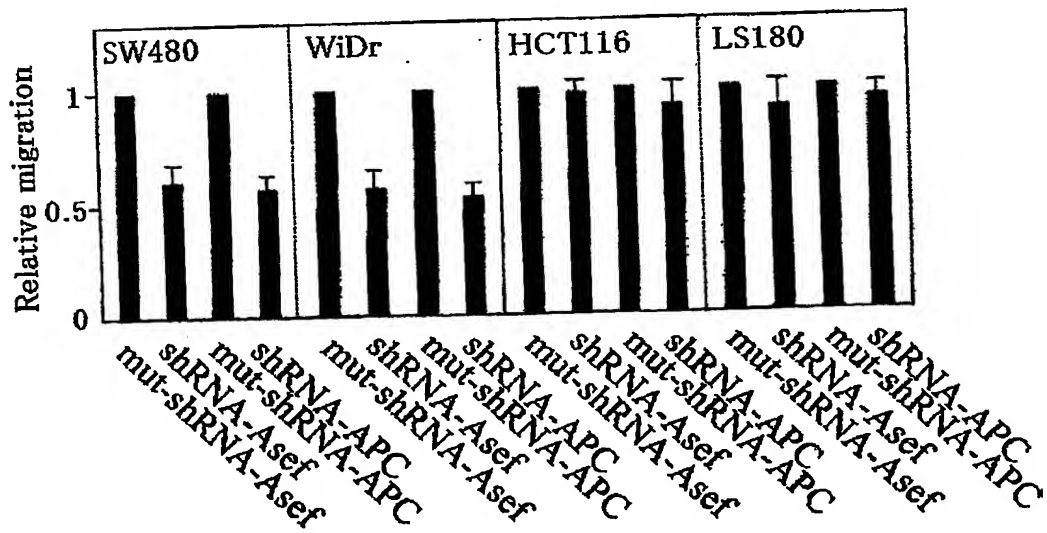
【図 3】



【図 4】



【図 5】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 腫瘍形成や発生過程において重要な役割を担う癌抑制遺伝子 APC の遺伝子産物と結合する蛋白質 Asef について、細胞における作用を明らかにし、その機能の調節により、Asef に起因する疾患の防止および治療を可能にする手段を提供すること。

【解決手段】 Asef の機能 (APC 遺伝子産物との結合またはグアニンヌクレオチド交換因子活性) 阻害および/または Asef 遺伝子の発現阻害を特徴とする大腸癌転移抑制剤並びに大腸癌転移抑制方法。

【選択図】 なし

特願2002-382083

出願人履歴情報

識別番号

[000002831]

1. 変更年月日

1990年 8月28日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都中央区日本橋3丁目14番10号

氏 名

第一製薬株式会社